

Aus dem Anatomischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Direktoren: Prof. Dr. M. Watzka, Prof. Dr. A. Mayet

**Untersuchungen zur postnatalen
Chemodifferenzierung der Prostata des Menschen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
Volkhard Bangert
aus Darscheid

Mainz 1971

1973

Aus dem Anatomischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktoren: Prof. Dr. M. Watzka, Prof. Dr. A. Mayet

Untersuchungen zur postnatalen Chemodifferenzierung
der Prostata des Menschen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt
von
Volkhard Bangert
aus
Darscheid

Mainz 1971



Fachbereichsdekan: Prof. Dr. O. Harth
Referent: Prof. Dr. G. Müller
Korreferent: Prof. Dr. M. Watzka
Tag der mündlichen Prüfung: 26.9.73

Gliederung

Seite

I. Einleitung

1. Morphologie und normale Entwicklung der Prostata	1
2. Histochemische Untersuchungen	2
3. Schleimsekretion bei Prostata-Tumoren	2
4. Fragestellung	3

II. Material und Methoden

1. Material	5
A. Fixierung	5
2. Methoden	
A. Orientierende Voruntersuchungen	6
B. Differenzierung der Polysaccharidanteile	10
1) Untersuchung der PAS-reaktiven Substanzen	11
2) Untersuchung der Hale-reaktiven Substanzen	14
3) Messung der Basophilie	17
4) Metachromasie-Untersuchung	20

	Seite
III. Befunde	
1. Morphologische Befunde	24
2. Histochemische Befunde	
A. Voruntersuchungen	26
1) Lipid-Nachweise	26
2) Protein-Nachweise	27
3) Nukleinsäuren-Nachweise	28
4) Polysaccharid-Nachweise	29
5) Mukopolysaccharid-Nachweise	30
B. Differenzierung der Polysaccharide	
1) Untersuchung der PAS-reaktiven Substanzen	34
2) Untersuchung der Hale-reaktiven Substanzen	37
3) Messung der Basophilie	41
4) Metachromasie-Untersuchung	43
C. Nebenfunde	46
IV. Diskussion	48
V. Zusammenfassung	56
VI. Literaturverzeichnis	57

I. EINLEITUNG

1. Morphologie und normale Entwicklung

Die normale Entwicklung der Prostata kann nach Stieve (1930) zeitlich in zwei große Abschnitte eingeteilt werden: Die Keimlingsentwicklung, die im ersten Lebensjahr abgeschlossen wird, und die Reifeentwicklung. Der Entwicklungsstand, den die Prostata beim einjährigen Kind erreicht hat, bleibt bis zum Beginn der Pubertät bestehen. Beim 11 - 12jährigen Knaben beginnt die Drüse sich zu verändern. Es kommt nun zur Zunahme des drüsigen Anteils. Die Drüsenschläuche wachsen in die Länge und neue solide Zellzapfen, die sich gleich denen der Embryonalentwicklung verhalten, entstehen. Das Verhältnis von glatter Muskulatur und Bindegewebe zu den Drüsen verschiebt sich zu Gunsten der letzteren. Diese Entwicklung dauert bis zum 21. - 22. Lebensjahr. Die endgültige Differenzierung der Prostata ist also wesentlich später abgeschlossen, wie die der übrigen Genitalorgane.

2. Histochemische Untersuchungen an der Prostata

Bei zahlreichen histochemischen Untersuchungen der Drüsenepithelien der menschlichen Vorsteherdrüse wurden besonders häufig die verschiedenen Fraktionen der Prostatalipide beschrieben (Sehrt 1913, Ishihara 1914, Policard und Noël 1920, Pretl 1948, Mann 1964, Leutert 1970).

Drüsenzellen und Prostatasekret enthalten demnach Cholesterin und Cholesterinester, Neutralfette, freie Fettsäuren und Phospholipide.

Dagegen finden sich im Schrifttum nur wenige Arbeiten über die Kohlenhydrate der Prostataepithelien und des Sekretes (Schlachta 1904, Stieve 1930, Brandes u. Bourne 1962, Graumann 1964).

3. Schleimsekretion bei Prostata-Tumoren

Von besonderem Interesse ist das histologische und histochemische Verhalten bei pathologischen Veränderungen der Prostata (Adenome, Carcinome). Franks (1964) konnte bei histochemischen Unter-

suchungen an 44 Organen mit latenten Carcinomen und an 50 Organen mit klinisch manifesten Neoplasien finden, daß bei latenten und manifesten malignen Tumoren eine veränderte Schleimsekretion auftrat. Es wurden Sekrete gefunden, die sulfatierte Sialomucine enthielten. Diese Schleimsubstanzen sind selten in der normalen Vorsteherdrüse zu finden. Ihr Nachweis hat daher diagnostischen Wert.

4. Fragestellung

Eine eingehende histochemische Analyse der Prostataschleime kann zunächst deren chemische Natur aufklären und vermag das Sekret dann den einzelnen Zellen zuzuordnen. Weitere Untersuchungen müßten klären, ob bestimmte Schleimfraktionen, die bei pathologischen Veränderungen auftreten sollen, eine Zuordnung zu pathologischen Vorgängen zulassen, ob latente Neoplasien mit Screening-Tests, die auf spezifische Schleimfraktionen im Urin reagieren, frühzeitig zu erkennen sind.

Zur Ergänzung der mikroskopischen Anatomie der Prostata und um Aufschlüsse über die Histochemie der Prostatasekrete zu bekommen und damit die Grundlage und Voraussetzung für einen Screening-Test zu schaffen, wurde die postnatale Chemo-differenzierung der Prostata des Menschen mit Hilfe KH - histochemischer Methoden untersucht.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

Es wurden 10 menschliche Vorsteherdrüsen mit folgender Altersverteilung untersucht:
unter 1 J., 1 J., 6 J., 10 J., 13 J., 14 J., 15 J., 18 J., 24 J., 27 J. (Die Organe wurden mir freundlicherweise vom Pathologischen Institut der Universitätsklinik Mainz (Direktor: Prof. Dr. H. Bredt) zur Verfügung gestellt.) Es wurden nur Organe verwendet, die makroskopisch und mikroskopisch ohne pathologische Veränderungen waren.

A. Fixierung

Die durch Sektion frisch gewonnenen Organe wurden zugeschnitten und bei 24°C 2 - 5 Tage fixiert. Als Fixierungsflüssigkeiten dienten N-Cetylpyridiniumchlorid-Formol nach Williams, welches zur Stabilisierung saurer Mukopolysaccharide besonders geeignet ist, und Formol-Calciumchlorid-Cadmiumchlorid nach Baker, das

sich für die Konservierung von Lipiden gut eignet. Anschließend wurde das Material wie üblich in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und über Methylbenzoat und Benzol in Paraplast eingebettet. Es wurden 6 μm und 8 μm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Von jedem Lebensalter wurden 150 Schnitte hergestellt, die mit nachstehenden Methoden weiterbehandelt wurden.

2. Methoden

Der Untersuchungsgang gliederte sich in zwei Phasen:

A. Zur orientierenden Voruntersuchung wurden folgende Stoffklassen histochemisch untersucht:

1) Lipid - Nachweise

a) mit Sudanschwarz B (Lison)

Zur Darstellung kommen Phospholipide und Neutralfette.

- b) mit Luxol Fast Blue (Klüver u. Barrera)

Diese Färbung dient zum Nachweis von
Phospholipiden und Glykolipiden.

2) Protein - Nachweise

- a) mit Amidoschwarz 10 B (Mundkur u. Brauer 1966)

Selektive Darstellung von Histonen und
basischen Proteinen.

- b) mit der Ninhydrin-Schiff-Reaktion (Yasuma
u. Itchikawa)

Diese ist ein allgemeiner Proteinnachweis
durch Reaktion der endständigen Aminogruppen
mit Ninhydrin. Es kommt zur oxydativen Des-
aminierung, Bildung eines Aldehyds, CO_2 und
 NH_3 . Das gebildete Aldehyd wird mit der
Schiffischen Reagenz sichtbargemacht.

- c) mit der DDD-Reaktion (Barnett u. Seligman)

DDD reagiert mit proteingebundenen Sulf-
hydrylgruppen und bildet blaue bis rote
Farbkomplexe.

3) Nukleinsäuren - Nachweis

- a) mit der Gallocyanin-Chromalaun-Färbung
(Einarson)

aa) Ribonuklease - Kontrolle

Gallocyanin-Chromalaun verbindet sich mit den Phosphatgruppen der Nukleinsäuren. Plasmabezirke und Kernstrukturen die vor Ribonukleaseinkubation blau erscheinen und nach Enzymeinwirkung abgeschwächt oder nicht angefärbt sind, können als Ribonukleoproteide angesprochen werden (Spannhof 1964).

4) Polysaccharid - Nachweis

a) mit PAS (Hotchkiss u. Mc Manus)

Perjodsäure oxydiert 1,2-Glykol-, -CHOH-CHOH-, 1-Hydroxy-2-Amino-, -CHOH-CHNH₂-, 1-Hydroxy-2-Alkylamino-, -CHOH-CHNHR- und 1-Hydroxy-2-Ketogruppen-CHOH-CO- unter Spaltung der -C-C- Bindung zu Aldehydgruppen, die mit Leukofuchsin (Schiffssches Reagens) einen rosa bis rotvioletten Farbkomplex bilden.

5) Mukopolysaccharid - Nachweis

a) mit der Eisenbindungsreaktion (Hale - Müller)

Zum Nachweis saurer MPS wird das Eisen-

bindungsvermögen von sauren Gruppen komplexer Polysaccharide herangezogen. Ferrihydroxydsol wird gebunden und anschließend mit Kaliumferrocyanid als Berliner-Blau-Komplex dargestellt. Die Hale - Müller Färbung erfaßt Hyaluronsäure, Sialomucine, sulfatierte MPS.

b) Alcianblau pH 1,0 (Steedmann)

c) Alcianblau pH 2,0 (Steedmann)

Alcianblau färbt saure MPS entsprechend der Eisenbindungsreaktion. Der Wirkungsmechanismus ist nicht geklärt. Die pH - Unterschiede ermöglichen eine Unterscheidung zwischen sulfat- und carboxylsauren MPS.

d) Astrablau (Pioch 1957)

Mit basischem Kupferphthalocyanin werden einfache und komplexe MPS angefärbt. Die Affinität dieser Substanzen zum angebotenen Farbstoff ist an ihre sauren Gruppen gebunden. Die Färbung entspricht der Alcianblau-Färbung.

e) Alcianblau - Alciangelb (Ravetto)

Diese Färbung ermöglicht die Differenzierung zwischen sulfatsauren und carboxylsauren MPS, weil Alcianblau pH 0,5 von Sulfatgruppen gebunden wird, während Carboxylgruppen bei einem höheren pH Alciangelb binden. Die Sulfatradicale färben sich blau, die Carboxylgruppen gelb.

f) Hale - PAS (Ritter u. Oleson)

Diese Färbung ist die Kombination der oben beschriebenen. Die sauren MPS und Mukoproteine erscheinen wegen der sauren Radikale blau gefärbt, die PAS positiven neutralen Polysaccharide rosa bis rot-violett.

B. Differenzierung der Polysaccharidanteile

Zur Differenzierung der einzelnen Polysaccharidfraktionen wurden die Schnitte verschiedenen Vorbehandlungen unterworfen (Extraktionen, Blockaden, Hydrolysen) und anschließend mit der PAS - Reaktion und anderen KH - Nachweisen kontrolliert.

Bl. Untersuchung der PAS-reaktiven Substanzen

Vorbehandlungen

- a) Lipidextraktion mit Aceton 1 Tag bei 60°C (Pearse). Die PAS Reaktion fällt bei manchen Glykolipiden und anderen Substanzen (Lipofuszin) positiv aus. Um diese nicht den Polysacchariden zuzurechnenden Stoffklassen ausschließen zu können, werden die Lipide mit heißem Aceton aus dem Schnitt extrahiert.
- b) Acetylierung mit Essigsäureanhydrid und wasserfreiem Pyridin bei 40°C für 18 bis 48 Stunden (Pearse).
- c) Acetylierung und Verseifung (Pearse)
Acetylierung siehe oben und nachfolgend 0,1 n KOH für 45 Minuten.
Die Acetylierung blockiert Hydroxyl- und Aminoalkoholgruppen, die nicht mehr oxydiert und mit Schiffschen Reagens dargestellt werden können. Die anschließende Verseifung entacetyliert die blockierten Hydroxylgruppen, nicht aber die Aminoalkohole. Durch die Acetylierung gelingt es nachzuweisen, ob der positive Re-

aktionsausfall durch 1,2-Glykol- oder Aminoalkoholgruppen oder durch Äthylengruppen bedingt ist. Eine Färbung trotz Acetylierung spricht für Äthylengruppen. Die Differenzierung zwischen Hydroxygruppen und Aminoalkoholen wird durch die Verseifung getroffen.

d) Hydroxylaminblockade (Pearse) mit

Hydroxylaminchlorid und Natriumacetat

bei 60°C für 1 - 3 Stunden.

Aldehyde werden blockiert und können mit

Leukofuchsin (Schiffssches Reagens) keinen

Farbkomplex bilden.

e) Saure Hydrolyse (Quintarelli 1960)

Inkubation der Schnitte in McIlvaine -

Puffer pH 2,5 für 6 Stunden.

f) Alkalische Hydrolyse (Halbhuber 1965)

Die Schnitte werden in einer konzentrierten

alkoholischen Bariumhydroxidlösung bis zu

15 Stunden bei 56°C inkubiert.

Bei der sauren Hydrolyse wird, wenn die

Reaktionsprodukte Glykoproteine sind, die

PAS-Reaktion nicht verändert. Nach alkalischer

Hydrolyse ist die PAS-Reaktivität gelöscht.

g) Enzymextraktionen

1) Testis - Hyaluronidase (Pearse)

Inkubation der Schnitte mit 10 mg Testis-Hyaluronidase in 10 ml 0,85 % NaCl für 3 Stunden bei 37°C. Die Substrate für Testis-Hyaluronidase sind Hyaluronsäure, Chondroitinschwefelsäure A u. C.

2) Neuraminidase (Sialidase) (Ganter u. Jollès)

Enzymextraktion mit Neuraminidase aus *Vibrio Cholerae*, gelöst in 0,05 m Acetatpuffer bei pH 5,5 (Serva, Feinbiochemica, Heidelberg) für 6 Stunden bei 37°C.

Neuraminidase ist eine Glukosidase und spaltet die Sialinsäure vom Hexosamin und Trägerprotein ab. Löschung der PAS-Reaktion nach Neuraminidase spricht für Sialomucine.

3) Pepsin (Pearse)

0,02 n HCl (pH 1,6), die 2 mg Pepsin/ml HCl enthält, wirkte 3 Stunden bei 37°C auf den Schnitt ein. Pepsin wird zur Proteolyse verwendet, um Glykoproteine zu hydrolysieren.

Die Löschung der PAS-Reaktion nach Pepsin spricht für Glykoproteine.

4) Lysozym (Velican)

Die Schnitte wurden mit 5 mg Lysozym in 30 ml 0,02 m Phosphatpuffer pH 5,3 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Lysozym ist eine Hexosaminidase. Das N-Acetyl-Hexosamin in sauren Glykoproteinen (Sialomucin) wird von Lysozym abgespalten, und damit ist die PAS-Färbung negativ.

B2. Untersuchung der Hale-reaktiven Substanzen

Im Anschluß an die verschiedenen Vorbehandlungen, wurde das Reaktionsergebnis mit der Eisenbindungsreaktion nach Hale-Müller und der Alcianblau-Färbung bei pH 1,0 u. 2,0 kontrolliert. Dies ist notwendig, weil die Reaktion nach Hale die größte Empfindlichkeit unter den MPS-Nachweisen besitzt und mit der Alcianblau-Färbung bei verschiedenem pH eine Unterscheidung zwischen sulfat- und carboxylsauren MPS möglich ist.

Vorbehandlungen

- a) Lipidextraktion mit Aceton 1 Tag bei 60°C
(Pearse)

Diese Extraktion wurde vorgenommen, um eine Mitreaktion von Glykolipiden zu verhindern.

- b) Methylierung (Pearse)

Die Schnitte wurden mit 0,1 n HCl in absolutem Methanol für 3 Tage bei 24°C behandelt. Das Methanol unterdrückt die Reaktionsfähigkeit der sulfat- und carboxylsauren Gruppen der MPS. Auf diese Weise kann die Spezifität der Eisenbindungsreaktion und der Alcianblaufärbung pH 2,0 für saure MPS kontrolliert werden.

- c) Methylierung und Demethylierung

Behandlung der Schnitte mit der Methylierung und anschließend 0,1 n KOH während 45 Minuten. Die Methylierung und nachfolgende Demethylierung läßt die Differenzierung zwischen sulfat- und carboxylsauren MPS zu. Im Fall von carboxylsauren MPS fällt die Alcianblau- und Hale-Färbung nach der Demethylierung wieder positiv aus. Im Fall von sulfatsauren MPS bleiben die Substanzen ungefärbt.

d) Saure Hydrolyse (Quintarelli 1960)

Inkubation der Schnitte in McIlvaine-Puffer
pH 2,5 für 6 Stunden.

e) Desaminierung (Pearse)

Die Schnitte wurden 24 Stunden bei 4°C in
einer essigsäuren Nitritlösung inkubiert.
Aminogruppen bewirken durch sterische
Blockade eine Inaktivierung von sauren
Gruppen. Die Desaminierung führt zu einer
verstärkten Reaktion der sauren Radikale.

f) Enzymextraktionen

1) Testis - Hyaluronidase (Pearse)

Gleiche Vorbehandlung wie B₁g₁

Diese Vorbehandlung liefert den spezi-
fischen Nachweis für Hyaluronsäure, wenn
die vorher Hale-positiven Bezirke negativ
werden.

2) Neuraminidase

Gleiche Vorbehandlung wie B₁g₂

Wenn Neuraminidase auf Sialomucin einge-
wirkt hat, wird die Hale- und Alcianblau-
Färbung negativ ausfallen.

3) Pepsin

Gleiche Vorbehandlung wie B₁g₃

4) Papain (Velican)

Die Schnitte wurden mit 2 g Papain auf 100 ml 0,06 m Phosphatpuffer pH 6,5 für 3 Stunden bei 52°C inkubiert. Die Proteolyse mit Pepsin und Papain bewirkt eine Hydrolyse von sauren Glykoproteinen und ein Negativwerden der Alcianblau- pH 2,0 und Hale-Färbung.

5) Lysozym

Gleiche Vorbehandlung wie B₁g₄

Die Abtrennung des N-Acetyl-Hexosamins bei den Sialomucinen vom Trägerprotein erzielt eine Negativität der nachfolgenden Färbung.

B3. Messung der Basophilie

Die Basophilie-messung erlaubt eine Abschätzung der Menge an sauren Gruppen und ihre Zusammensetzung innerhalb der Zelle. Es wird dabei die Bindung eines basischen Farbstoffes bei verschiedenen pH-Stufen der Farblösung beobachtet.

Dazu wurde eine Pufferreihe von pH 2,2 bis pH 5,8 mit McIlvaine-Puffer hergestellt (Citronensäure-Phosphatpuffer, 0,1 m Citronensäure u. 0,2 m di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat (Arnold 1968)), deren Stufen sich um ein pH von je 0,6 unterschieden. Als Farbstoff wurde eine 0,05 %ige wässrige Toluidinblaulösung verwendet. Färbedauer: 30 Minuten. Wichtig ist, daß die Schnitte nach der Färbung in der gleichen Pufferlösung gespült und untersucht werden.

Durch verschiedene Vorbehandlungen ist es möglich, die sauren Gruppen aus dem Schnitt zu entfernen und durch Vergleich mit der Basophilie von Kontrollschnitten zu identifizieren.

Folgende Vorbehandlungen wurden gewählt:

a) Kontrolle

Die Schnitte werden ohne Vorbehandlung gefärbt.

b) Desaminierung (Pearse)

Vorgang wie bei B₂e

Durch sterische Blockade können Aminogruppen saure Gruppen inaktivieren. Durch die Desami-

nierung müßte daher eine Intensivierung der Basophilie auftreten.

c) Methylierung (Pearse)

Vorbehandlung wie bei B₂b

Methanol unterdrückt die Reaktionsfähigkeit von sulfat- und carboxylsauren MPS. Die Basophilie müßte demnach aufgehoben sein.

d) Enzymextraktionen

1) Testis - Hyaluronidase

Vorbehandlung wie bei B₁g₁

Durch diese Vorbehandlung kann geklärt werden, ob die Basophilie durch Hyaluronsäure verursacht ist.

2) Ribonuklease (Pearse)

Ribonukleaselösung (0,1 - 0,5 mg / 1 ml aqua dest.) wird für 1 Stunde bei 37°C auf die Schnitte aufgebracht. Die Basophilie von Drüsenzellen (z.B. Pankreas) oder Nervenzellen (Nisslsubstanz) ist im wesentlichen auf den Gehalt an Nukleinsäuren zurückzuführen. Durch den sogenannten Brachet - Test mit Ribonuklease kann dies nachgewiesen werden.

B4. Metachromasie - Untersuchung

Unter Metachromasie versteht man die Eigenschaft verschiedener Substanzen (z.B. Heparin, Chondroitinsulfat), sich bei Färbungen mit bestimmten Farbstoffen in einem anderen Farbton anzufärben, als dem des verwendeten Farbstoffs. Die dargestellte Substanz wird auch als Chromotrop bezeichnet. Da die Metachromasie von verschiedenen Faktoren abhängig ist (Konzentration u. pH der Farblösung, Lösungsmittel, Ionenkonzentration), ermöglicht sie gewisse Charakterisierung des Chromotrops. Die früher verwendeten Thiazinfarbstoffe Methylenblau, Azur A und das Pseudoisocyanin haben zahlreiche Nachteile; es wurde deshalb der von Töpfer (1968) eingeführte Farbstoff Dimethylmethylenblau verwendet. Färbevorgang:

- 1) Einstellen der Schnitte in McIlvaine-Puffer
pH 2,5 u. 3,5 für 1/2 Stunde
- 2) 1/2 Stunde färben in 0,01 % Dimethylmethylenblau bei pH 2,5 u. pH 3,5
- 3) Nachspülen im McIlvaine-Puffer pH 2,5 u. pH 3,5.

Durch folgende Vorbehandlung wurde die Aussagekraft dieser Untersuchung verbessert:

a) Kontrolle

Färbung unbehandelter Schnitte.

b) Methylierung

Vorgang wie bei B₂b

Die Reaktionsfähigkeit von sulfat- und carboxylsauren Gruppen wird durch die Methylierung unterdrückt. Damit kann kontrolliert werden, ob die Metachromasie durch diese Radikale hervorgerufen wird.

c) Enzymextraktionen

1) Testis - Hyaluronidase

Vorbehandlung wie B₁g₁

Hyaluronsäure ist fraglich metachromatisch.

Um die rot gefärbten Substanzen eventuell als Hyaluronsäure identifizieren zu können, wurde diese Extraktion vorgenommen.

2) Papain

Extraktion wie B₂^f₄

3) Pepsin

Extraktion wie B₁g₃

Die Proteolyse bewirkt eine Hydrolyse des

Trägerproteins von Glykoproteinen (Sialomucin) und dadurch eine Löschung der Metachromasie.

4) Ribonuklease

Extraktion wie B_2d_2

Nukleinsäuren sind metachromatisch. Inwieweit Ribonukleinsäuren an dem positiven Reaktionsausfall beteiligt waren, soll durch den enzymatischen Abbau geklärt werden.

d) Induzierte Metachromasie

Unter induzierter Metachromasie versteht man die durch Behandlung mit Schwefelsäure künstlich erzeugte Metachromasie. Hyaluronsäure, Glykogen, einige Glykoproteine und Glykolipide reagieren nach der Sulfatierung metachromatisch. Die Ergebnisse der PAS-Reaktion entsprechen etwa denen dieser Färbung.

Vorgang: 1) Entparaffinieren und trocknen der Schnitte 2) Einstellen für 10 Minuten in eine Lösung von gleichen Teilen konzentrierter Schwefelsäure (98 %) und Eisessig (99,9 %) bei 0°C nach Moore u. Schoenberg.

Die Anwesenheit der Essigsäure verhindert, daß die konzentrierte Schwefelsäure die Schnitte zerstört (Velican 1969).

3) Auswaschen in Eisessig 4) Spülen in aqua dest. 5) Färben in 0,01 % Dimethylmethylenblau pH 2,5 u. pH 3,5 für 1/2 Stunde 6) Im McIlvaine-Puffer pH 2,5 u. pH 3,5 nachspülen.

Die Färbungen und Vorbehandlungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, nach den beschriebenen Methoden von Pearse 1961, Velican 1969, Ganter u. Jollès 1969 und Romeis 1968 durchgeführt.

III. BEFUNDE

1. Morphologische Befunde

Morphologisch finden sich die typischen Merkmale der kindlichen, jugendlichen und erwachsenen Prostata. Beim Neugeborenen ist die Vorsteherdrüse annähernd kugelig und besteht hauptsächlich aus glatter Muskulatur und Bindegewebe. Solide Zellzapfen und Zellstränge sind zu beobachten. Verschiedentlich können auch Drüsen-schläuche gesehen werden, die mit Plattenepithel ausgekleidet sind. Beim einjährigen Knaben besteht das Organ noch zum überwiegenden Teil aus Bindegewebe und Muskulatur. Die Drüsen-schläuche verteilen sich gleichmäßig über das ganze Organ. Solide Zellbalken und Zellzapfen sind nicht mehr vorhanden. Dieses morphologische Bild bleibt nur leicht verändert auch beim 10jährigen Knaben bestehen. Den Einfluß der Pubertät sieht man deutlich an der Veränderung der Vorsteherdrüse des 13jährigen. Bindegewebe und Muskulatur sind zwar immer noch der größere Anteil; die Zunahme der Drüsen ist

aber offensichtlich. Die Schläuche sind oft sehr eng und von Zylinderepithelzellen ausgekleidet. Die Drüsenschläuche teilen und verästeln sich, was besonders in den äußeren Abschnitten der Drüse auffällig ist. Die Prostata des 18jährigen zeigt schon beinahe die Morphologie einer reifen Prostata. Als voll entwickelte Prostata kann die des 24- und 27jährigen angesehen werden. Die tubulo-alveoläre Drüse ist von glatter Muskulatur durchsetzt. Überwiegend besteht das Organ jetzt aus drüsigen Anteilen, die besonders in der Peripherie sehr weitlumig sind. Innere und äußere Drüsenanteile können nach dem Aussehen des Epithels nur schwer unterschieden werden. Das Prostatasekret beim 1jährigen liegt meist am apikalen Zellrand. Bei den jugendlichen und vollausgebildeten Organen findet man das Sekret homogen im Lumen verteilt; es hat meist keine Berührung mit den Drüsenzellen.

2. Histochemische Befunde

A. Voruntersuchung

1) Lipidnachweise

Bei der Sudanschwarz-Färbung ist der apikale Zellsaum der Drüsenzellen schwach rauchgrau gefärbt. Mit zunehmendem Alter der Drüsen nimmt die Intensität dieser Anfärbung zu. Das Prostatasekret ist teils ungefärbt, teils kräftig braunschwarz. Bei dem reifen Organ zeigen sich in den Drüsenzellen supranukleär gelegene schwarze Granula.

Die Phospholipid-Darstellung mit Luxol Fast Blue bringt ähnliche Ergebnisse wie die Sudanschwarz-Färbung. Es ist eine Zunahme von blaugrünen Granula und Plaques bei zunehmendem Lebensalter festzustellen. Sie liegen am apikalen Zellsaum der Drüsenzellen und treten nach der Pubertät vermehrt auf.

Bei den dargestellten Granula handelt es sich um Phospholipide, vielleicht auch um Glykolipide und höhere Neutralfette, die besonders während

der Geschlechtsreife auftreten, allerdings auch schon in der kindlichen Drüse nachweisbar sind. Das angefärbte Prostatasekret läßt auf den Gehalt von Lipiden schließen, zumal auch im Ejakulat diese Substanzen gefunden werden.

2) Protein-Nachweise

Bei der Färbung mit Amidoschwarz 10 B und der Ninhydrin-Schiff-Färbung erweisen sich der apikale Zellsaum und das Sekret als negativ. Bei der ersten Färbung stellen sich die Histone der Kerne in den Drüsenzellen dar. Das Cytoplasma ist meist ungefärbt, stellenweise aber schwach dunkel tingiert. Mit der DDD-Reaktion darstellbare rötliche Sekretkörner im supranukleären Bereich deuten bei der Prostata des 18jährigen auf proteingebundene Sulfhydrylgruppen hin. Die Epithelzellen bei der Drüse des Erwachsenen verhalten sich unterschiedlich im Reaktionsausfall. Hohe Epithelzellen erscheinen tiefrot, niedrige sind nur schwach tingiert. Das Sekret ist hier blaßrosa, was auf eine geringe Konzentration von SH-haltigen Proteinen schließen läßt.

Der Protein-Nachweis macht deutlich, daß der Proteingehalt der Prostataepithelien mit der Sekretion korreliert. Die positiven Sekretkörner im supranukleären Bereich (eventuell im Bereich des Golgi-Apparates) macht dies wahrscheinlich.

3) Nukleinsäuren-Nachweis

Die Gallocyanin-Chromalaun-Färbung zeigt eine mäßige RNS-Beladung des Cytoplasmas. Bei präpubertären Organen ist eine Vermehrung des RNS-Gehaltes des Cytoplasmas auffällig. Gelegentlich erscheint der apikale Zellsaum stärker tingiert. Mit zunehmendem Alter lockert sich dagegen die Chromatinstruktur der Kerne stärker auf, so daß beim Erwachsenen der bläschenförmige Zellkern nur noch ein lockeres, wabiges Chromatingerüst erkennen läßt. Die Ribonuklease-Vorbehandlung bewirkt eine Löschung der Cytoplasma-Basophilie in allen Lebensaltern. Besonders auffällig ist die Nukleinsäure-Extraktion durch Ribonuklease im Cytoplasma der Prostataepithelien der 13 bis 16jährigen.

Die Nukleinsäuren-Nachweise deuten darauf hin, daß bei präpubertären und bei Organen zwischen 13 und 16 Jahren eine Vermehrung des RNS-Gehaltes des Cytoplasmas besteht.

4) Polysaccharid-Nachweise

Der KH-Nachweis mit der PAS-Reaktion fällt beim Sekret von jugendlichen Organen schwach bis stark positiv aus. Der apikale Zellsaum färbt sich tief purpurfarben an; supranukleär liegen zahlreiche rote Granula. Bei der Vorsteherdrüse des 18 und 27jährigen ist ein besonders stark angefärbtes Sekret festzustellen. Das Cytoplasma der Drüsenzellen stellt sich diffus rot dar. Der lumenwärtige Zellrand ist mit Sekret belegt, das sich PAS-positiv verhält. Intrazellulär am apikalen Zellpol verteilen sich rotgefärbte Sekretkörner.

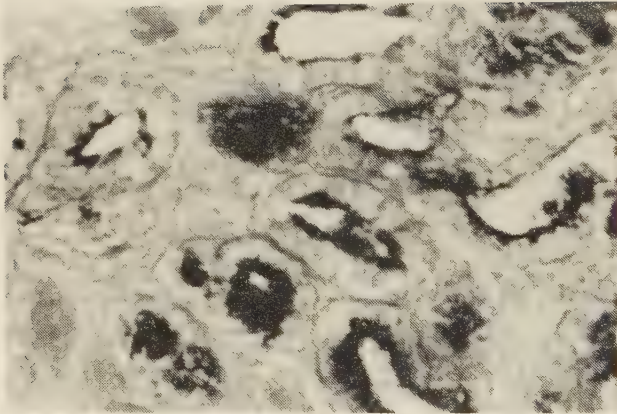


Abb.1 PAS Färbung der Prostata des
18jährigen (Vergr. 25fach)

5) Mukopolysaccharid-Nachweis

Die Eisenbindungsreaktion nach Hale stellt bei der Prostata des 1jährigen grobe Flocken von tiefblau dargestelltem Sekret dar, das unscharf vom ebenfalls kräftig blauen Zell-
saum abzugrenzen ist. Die Menge der mit der Eisenbindungsreaktion faßbaren sauren MPS nimmt von den zentralen Drüsenanteilen zur Peripherie hin zu. Die Halesche Reaktion fällt bei den späteren Stadien ohne größere Unter-

schiede etwas schwächer aus. Demnach scheint in den ersten Lebensmonaten eine intensive Schleimsekretion in der Prostata stattzufinden. Die Alcianblaufärbung ergibt nur bei einem pH von 2,0 eine Anfärbung verschiedener Strukturen, die denen der Reaktion nach Hale entspricht. Bei einem pH von 1,0 fällt die Alcianblau-Reaktion negativ aus.

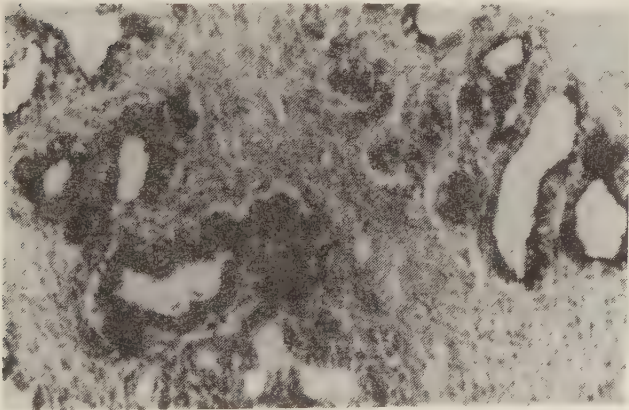


Abb.2 Reaktion nach Hale - Müller beim Organ
des 1jährigen (Vergr. 10fach, Blaufilter)

Die Hale-Färbung und die Alcianblaufärbung pH 2,0 gleichen sich im Reaktionsausfall, wenn die Fixierung nicht mit N-Cetylpyridiniumchlorid-Formol nach Williams erfolgte.

Topographisch gleiche Bezirke zeigen den Nachweis für carboxylsaure MPS, der bei den jugendlichen Organen stärker ausfällt als bei den erwachsenen.

Die Gelbfärbung des Drüsenepithels, der Zellkerne und des Sekretes bei der Färbung mit Alcianblau - Alciangelb läßt darauf schließen, daß die reagierenden Radikale carboxylsaure Gruppen sind.

Die kombinierte Hale-PAS-Reaktion stellt die intrazellulären Sekretkörner bei der Drüse des einjährigen tiefblau dar. Ebenso ist das Sekret dunkelblau; es zeigt sich nur an wenigen Stellen leicht rötlich. Oft lagert sich das blaue Sekret am lumenwärtigen Rand der Drüsenzellen an. Die Prostata des 10jährigen enthält nur noch blaue Bezirke. Eine Rotfärbung kann nirgendwo mehr festgestellt werden. Im Cytoplasma

des Organs vom 13jährigen Jungen sind die Sekretkörner blau und befinden sich teils basal und teils apikal. Der Zellsaum erscheint vorwiegend blau und blauviolett. Das Sekret verhält sich unterschiedlich, manchmal rot, stellenweise blau. Eine Zunahme der PAS-positiven Substanzen ist im Sekret und am apikalen Zellsaum der Vorsteherdrüse des 18jährigen offenkundig. Ausschließlich rote Substanzen kennzeichnen das Organ des Erwachsenen. Das Sekret, das Cytoplasma der Drüsenzellen und der apikale Zellsaum sind tiefrot angefärbt. PAS-positive Sekretkörner finden sich ausschließlich am apikalen Pol der Drüsenzellen.

Diese Befunde verstärken die Annahme, daß bei jugendlichen Organen saure MPS vorherrschen, bei erwachsenen Drüsen Kohlenhydrate, die auch PAS-positiv sind.

B. Differenzierung der Polysaccharidanteile

1. Untersuchung der PAS-reaktiven Substanzen

Die Lipidextraktion mit heißem Aceton beeinflusst die PAS-Reaktion nicht. Demnach ist der Reaktionsausfall der PAS-Färbung nicht an Lipide gebunden. Die Acetylierung hebt die Rotfärbung in allen Schnitten auf. Acetylierung mit anschließender Verseifung ergeben keine Verstärkung der PAS-Reaktion. Es kann sich also nicht um Äthylengruppen handeln; diese müßten sich nach der Acetylierung noch darstellen. Weiterhin können nicht Aminoalkoholgruppen die Reaktion bewirkt haben, weil diese Gruppen nicht entacetyliert werden können. Folglich haben 1,2-Glykolgruppen die PAS-Reaktion bewirkt (Tabelle 1).

Der Reaktionsausfall nach Hydroxylaminblockade zeigt keine Änderung.

Die Vorbehandlung mittels saurer und alkalischer Hydrolyse läßt erkennen, daß die saure Hydrolyse nahezu keinen Einfluß auf die PAS-Reaktion hat. Die alkalische Hydrolyse mit Bariumhydroxid führt dazu, daß das Sekret und die roten intra-

zellulären Granula der jugendlichen Organe abgeschwächt werden. Eine starke Reduzierung erfährt die PAS-Reaktion bei den Organen der 18 und 27-jährigen (Tabelle 2).

Tabelle 1

	PAS		PAS		PAS	
			Acetylierung		Acetylierung u. Verseifung	
	api- kaler Zell- Saum	extra- zellu- läres Sekret	api- kaler Zell- Saum	extra- zellu- läres Sekret	api- kaler Zell- Saum	extra- zellu- läres Sekret
1 J.	++	+++	∅	∅	++	+++
10 J.	+	-	∅	-	+	-
13 J.	+	+++	∅	∅	+	+++
18 J.	+	+++	∅	∅	+	+++
27 J.	++	+	∅	∅	++	+

Tabelle 2

	PAS		PAS	
	saure Hydrolyse		alkalische Hydrolyse	
	apikaler Zellsaum	extra- zelluläres Sekret	apikaler Zellsaum	extra- zelluläres Sekret
1 J.	++	+++	+	+
10 J.	+	-	+	-
13 J.	+	+++	(+)	(+)
18 J.	+	+++	∅	∅
27 J.	++	+	(+)	(+)

Die Inkubation mit Testis-Hyaluronidase beeinflusste die PAS-Färbung in keinem Lebensalter entscheidend; nur trat bei der Vorsteherdrüse des Erwachsenen eine Verstärkung dieser Reaktion auf. Ebenso ohne merklichen Einfluß blieb die Neuraminidaseeinwirkung. Die Lysozymbehandlung verdeutlicht die Wirkung der alkalischen Hydrolyse. Die jugendlichen Organe zeigen eine geringe Abschwächung, die Organe der Erwachsenen eine starke Reduzierung. Die Proteolyse mit Pepsin läßt bei dem Organ des 1 und 10jährigen kaum einen eindeutigen Befund zu, da das Epithel fast vollständig

verdaut war. Die Veränderungen beim 13jährigen sind nur schwer festzustellen, während beim 18 und 27jährigen eine deutliche Reduzierung oder Löschung der PAS-Reaktion eintritt.

Die Ergebnisse der PAS-Reaktion nach verschiedener Vorbehandlung können folgendermaßen zusammengefaßt werden:

Es handelt sich um perjodatoxydable Substanzen, die von der alkalischen Hydrolyse, Lysozym- und Pepsininkubation im Reaktionsausfall gemindert werden und zwar bei den jugendlichen Organen weniger stark als bei den erwachsenen. Es handelt sich demnach um sialinsäure Glykoproteine.

B2. Untersuchung der Hale - reaktiven Substanzen

Die Reaktion nach Hale im Anschluß an die Lipidextraktion ergibt keinen Unterschied zu den Kontrollpräparaten. Es finden sich an den grobflockigen Hale-reaktiven Reaktionsprodukten Aussparungen, die nicht angefärbt erscheinen. Dies kann bei der Hale-PAS-Färbung nicht festgestellt werden. In allen Lebensaltern führt

die Methylierung zur Blockade der Reaktion. Die anschließende Demethylierung stellt den ursprünglichen Reaktionsausfall wieder her. Verstärkte Reaktionen fanden sich nicht. Durch die saure Hydrolyse kommt die Eisenbindungsreaktion bei den Organen der Erwachsenen zum Erliegen. Die jugendlichen Drüsen erfahren eine Abschwächung. Eine verstärkte Hale-Reaktion nach der Desaminierung ist nicht eindeutig.

Nach Hyaluronidasebehandlung findet sich in der Prostata des 1jährigen eine sehr starke Abschwächung; die an Kontrollschnitten tiefblauen Bezirke sind nicht mehr nachweisbar. Der Zellsaum ist nur noch blaßblau; in den Epithelzellen liegen wenige schwachblaue Granula. Das Organ des 10jährigen verhält sich ähnlich, nur ist hier kein Sekret vorhanden, das beurteilt werden könnte. Die Vorsteherdrüse des 13jährigen zeigt insgesamt eine Abschwächung der Anfärbung, wobei das Sekret stärker betroffen ist. Eine Verminderung des tiefblauen Reaktionsprodukts ist bei der Drüse des 18 und 27jährigen nicht nachweisbar. Nach Sialidaseeinwirkung weist

das Sekret und der apikale Zellsaum der jugendlichen Organe eine leichte Abschwächung auf. Die gleiche Vorbehandlung bewirkt eine fast vollständige Löschung der Eisenbindungsreaktion beim 18 und 27jährigen. Dieser Befund entspricht der Vorbehandlung durch Säurehydrolyse.

Durch Proteolyse mit Papain und Pepsin werden beim 1jährigen das grobflockige, tiefblaue Sekret und der kräftig blaue Zellsaum in ihrer Intensität abgeschwächt. Diese Verminderung besteht bei allen jugendlichen Organen. Das blaufärbte Sekret und die reagierenden Cytoplasma-bezirke des 18 und 27jährigen erweisen sich als papain- und pepsinlabil.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß die Substanzen, die sich mit der Hale-Reaktion und der Alcianblau-Färbung pH 2,0 darstellen lassen, durch die Methylierung blockiert werden, durch die Demethylierung wieder reaktionsfähig werden, daß die jugendlichen Organe hyaluronidaselabil sind. Die Proteolyse bewirkt eine Verminderung und Löschung (Tabelle 3).

Tabelle 3

	PAS		Hale		PAS		Hale	
					Sialidase		Sialidase	
	api- kaler Zell- Saum	extra- zellu- läres Sekret	api- kaler Zell- Saum	extra- zellu- läres Sekret	api- kaler Zell- Saum	extra- zellu- läres Sekret	api- kaler Zell- Saum	extra- zellu- läres Sekret
1 J.	++	+++	++	+++	++	+++	+	++
10 J.	+	-	+	-	+	-	∅	-
13 J.	+	+++	+	+++	+	+++	(+)	(+)
18 J.	+	+++	++	++	+	+++	(+)	∅
27 J.	++	+	++	++	++	+	∅	∅

Neben der Hale-Reaktion wurde jeweils eine Kontrollfärbung mit Alcianblau pH 1,0 und pH 2,0 vorgenommen. Die Alcianblaufärbung pH 2,0 fiel entsprechend der Eisenbindungsreaktion aus. Alcianblau bewirkte bei pH 1,0 keine Anfärbung der verschiedenen Strukturen (Ausnahme: Mastzellen).

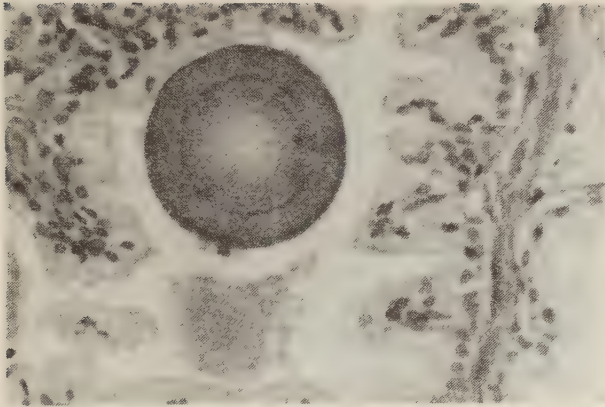


Abb.3 Färbung nach Hale - Müller nach
Neuraminidasevorbehandlung beim
Organ des 27jährigen (Vergr. 25fach)

B3. Messung der Basophilie

Die Schnitte, die in die Pufferreihe von pH 2,2 bis pH 5,8 eingestellt wurden, zeigen eine Basophilie bei einem pH von 3,4 aufwärts. Unterhalb von pH 3,4 ist keine Basophilie feststellbar. Das Cytoplasma der Drüsenzellen weist eine gleichmäßig starke Basophilie auf. Die Farbtintensität von Zellsaum und Sekret sind weniger ausgeprägt. Die Organe der 1, 10 und 13jährigen zeigen eine stärker blaue Anfärbung als die der 18 und 27-

jährigen. Die Desaminierung führt zu einer merklichen Intensivierung der Basophilie, ohne eine Unterscheidung zwischen den Lebensaltern deutlich werden zu lassen. Die Methanolbehandlung unterdrückt die Reaktion bei allen Lebensaltern. Die Enzymextraktion mit Testis-Hyaluronidase schwächte die Basophilie bei den jugendlichen Organen deutlich ab, beeinflusste die Reaktion beim Erwachsenen aber nicht. Besonders auffällig ist nach der Ribonukleasebehandlung die Abschwächung der Basophilie des Cytoplasmas bei 13 bis 16jährigen. Bei den Organen des Erwachsenen kann eine Verminderung nicht beobachtet werden.

Die Basophilie-messung ergibt, daß die sich darstellenden basophilen Substanzen folgende Eigenschaften haben: Sie binden Toluidinblau noch bei einem pH von 3,5; die Basophilie ist bei jugendlichen Organen stärker ausgeprägt; sie wird durch Methylierung blockiert und die Hyaluronidase schwächt die Reaktion ab.

In den Drüsenzellen der Organe des Pubertätsalters tritt eine ribonuklease-sensible Basophilie auf, die deutlich gegen die MPS-bedingte Basophilie abzugrenzen ist.

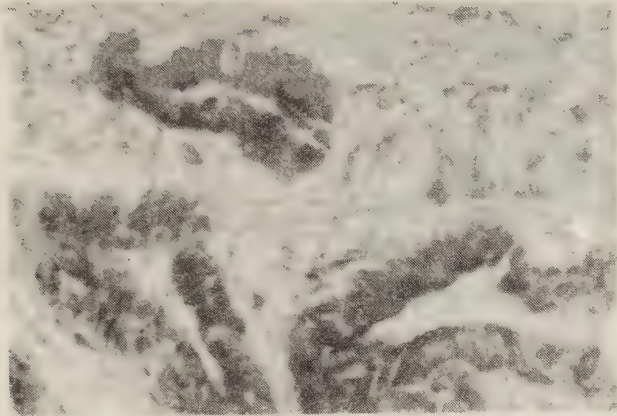


Abb.4 Basophilieuntersuchung, Färbung mit
Toluidinblau pH 3,5, bei der Prostata
des 13jährigen (Vergr. 40fach)

B4. Metachromasie-Untersuchung

Eindeutig metachromatisch reagierende Substanzen lassen sich nur in der Prostata des Erwachsenen mit Dimethylmethylenblau bei pH 3,5 nachweisen. Das Chromotrop liegt intrazellulär in Kernnähe, häufig im Bereich des Golgiapparates. Es stellt sich in Form grober Flocken dar. Die wenigen mehr apikal liegenden chromotropen Substanzen sind

schwächer rot gefärbt und feinkörniger. Der Zell-
saum färbt sich nicht metachromatisch und das intra-
luminär liegende Sekret ist schwach rot tingiert.

Die Methanolbehandlung, die sulfat- und carboxyl-
saure Radikale blockiert, unterdrückt die Meta-
chromasie. Hyaluronidase- und Ribonukleasebehandlung
verändert den metachromatischen Reaktionsausfall
nicht. Die Proteolyse durch Pepsin und Papain bringt
die Rotfärbung zum Verschwinden. Die Mastzellen
bleiben weiterhin metachromatisch gefärbt.

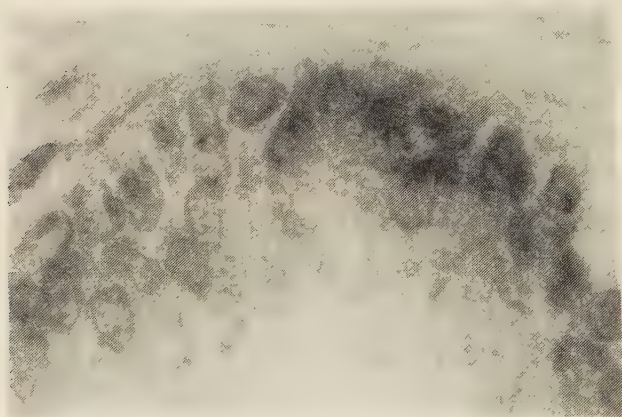


Abb.5 Metachromasieuntersuchung, Färbung mit
Dimethylmethylenblau pH 3,5 bei der
Prostata des 18jährigen nach Hyaluronidasevorbehandlung (Vergr. 100fach)

Die induzierte Metachromasie, die mit Schwefelsäure durchgeführt wurde, bringt andere Ergebnisse. Hier sind die jugendlichen Organe metachromatisch, während die Drüse des Erwachsenen keine Reaktion zeigt. Bei der Prostata des 1jährigen sind in den Drüsenzellen sowohl apikal als auch basal rote Substanzen zu finden. Das intraluminäre Sekret ist deutlich rot. Dieses Verhalten ist auch beim 10 und 13jährigen vorhanden. Nur liegen hier die roten Reaktionsprodukte meist am apikalen Pol der Drüsenzelle.

Die Ergebnisse der Metachromasie-Untersuchung können wie folgt zusammengefaßt werden:

Chromotrope Substanzen werden nur bei der Prostata des Erwachsenen gefunden.

Methylierung blockiert die Reaktion, ebenso die Proteolyse; die metachromatischen Substanzen sind nicht hyaluronidase- und ribonukleaselabil. Es handelt sich dabei um Sialomucine.

Die induzierte Metachromasie tritt nur bei jugendlichen Organen auf und wird durch Hyaluronsäure bewirkt.

C. Nebenbefunde

Die Prostatasteine

Die Drüsenschläuche des 24 und 27jährigen Mannes enthalten neben dem Sekret auch Prostatasteine. Bei den jugendlichen und kindlichen Organen können diese Konkreme nicht gesehen werden. Die Gebilde zeigen unterschiedliche morphologische Strukturen. Es sind große runde oder ovale, manchmal dreieckige Steine oder kleine unregelmäßige Stäbchen.

Bei der Anfärbung mit Sudanschwarz B zeigt sich das Zentrum und die äußerste Schicht leicht rötlich-braun. Der Kern der Steine stellt sich nach Amidoschwarz 10 B Färbung dunkel tingiert dar. Die Nukleinsäuren wurden mit Gallocyanin-Chromalaun nachgewiesen. Die Corpora amylacea werden vor allem am äußeren Rand ganz leicht blau angefärbt. Diese Färbung ist kaum merklich ribonukleaselabil. Der Nachweis von sauren MPS mit der Eisenbindungsreaktion nach Hale - Müller und mit Alcianblau pH 2,0 läßt eine konzentrische Schichtung der sauren Substanzen erkennen. Der Kern der Steine ist nicht

angefärbt. Die PAS-Reaktion bewirkt eine homogene Anfärbung des Konkrementes.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Corpora amylacea aus Kohlenhydraten mit 1,2-Glykolgruppierungen bestehen. Weiterhin müssen saure MPS angenommen werden (Graumann 1964). Der Kern der Steine bewirkt eine positive Lipidreaktion. Die geringe ribonukleaselabile Gallocyanin-Chromalaunfärbung gibt Hinweise auf das Vorliegen von Nukleinsäuren (Schrodt u. Murray 1966).

Die corpora amylacea bestehen also aus:

- 1) Kohlenhydraten mit 1,2-Glykolgruppierung
- 2) sauren Mukopolysacchariden
- 3) Nukleinsäuren
- 4) Lipiden

IV. DISKUSSION

Die Befunde der lipidhistochemischen Nachweise zeigen, daß der Lipidgehalt während der Geschlechtsreife vermehrt ist und in enger Beziehung zu der sekretorischen Aktivität der Drüsen steht. Im Schrifttum werden die Lipide als physiologische Bestandteile der Drüsenzellen beschrieben und im Prostatasekret nachgewiesen (Sehrt 1913, Ishihara 1914, Mann 1964, Kolb 1964, Leutert 1970).

Mit den angewendeten Übersichtsfärbungen läßt sich ein nur schwacher Proteingehalt der Drüsenepithelien darstellen. Das Cytoplasma ist mit Ausnahme bei der DDD-Reaktion meist ungefärbt und nur stellenweise dunkel tingiert. Bei der DDD-Reaktion finden sich bei dem Organ des 18-jährigen rötliche Sekretkörner im supranukleären Bereich. Hohe Epithelzellen erscheinen tiefrot, niedrige sind nur schwach gefärbt. Der Proteingehalt korreliert mit der Sekretionsfähigkeit der Epithelzellen. Die während der Pubertät nachweisbar verstärkte Basophilie ist auf den vermehrten

Gehalt an Ribonukleoproteide zurückzuführen.

Dies wurde mit der Ribonukleaseinkubation nachgewiesen.

Die Ergebnisse der kohlenhydrat-histochemischen Untersuchungen beweisen die Abhängigkeit der chemischen Zusammensetzung des Prostatasekretes und der intrazellulären Substanzen in Abhängigkeit von der postnatalen Entwicklung. Die Sekrete und Prosekrete der postpubertären Drüsen sind perjod-oxidabel und Hale-positiv. Die PAS-Reaktion ist im Gegensatz zur Eisenbindungsreaktion nicht sialidaseempfindlich.

Diese Befunde deuten darauf hin, daß es sich bei dieser Sekretkomponente um saure Glykoproteine (Sialomucine) handelt (Halbhuber u. Geyer 1965). Im Schleim der Glandula submaxillaris des Schafes und Rindes (Gottschalk 1957, Pigman u. Hashimoto 1963) und im Cervikalschleim des Rindes (Wrobel 1971) konnten biochemisch und histochemisch Glykoproteine nachgewiesen werden. Die Tatsache, daß bei Verwendung von Kombinationsfärbungen unterschiedlich angefärbte Granula nebeneinander liegen,

läßt Wrobel (1971) vermuten, daß das Cervix-glykoprotein des Rindes aus polydispersen Molekülen besteht, aber grundsätzlich gleich aufgebaut ist und sich im Feinbau nur geringfügig unterscheidet. Das Grundgerüst der Sialomucine ist eine Polypeptidkette, deren Seitenketten aus Oligosacchariden besteht und Sialinsäure enthält. Die Sialinsäure und das Trägerprotein sind durch ein Hexosamin verbunden.

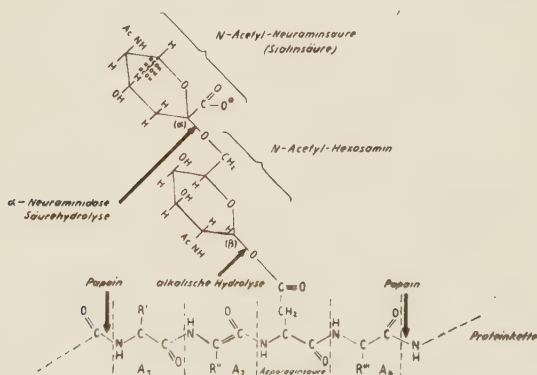


Abb.6 Chemischer Aufbau des Submaxillarismucins des Schafes u. Angriffsorte von Enzymen u. anderen Abbaumethoden (nach Pigman u. Gottschalk aus Halbhuber, U. u. K.-J. Halbhuber 1970)

Die Eisenbindungsreaktion wird durch die COO^- - Gruppen der Sialinsäure positiv. Die PAS-Reaktion reagiert mit der Sialinsäure und dem Hexosamin.

Der histochemische Nachweis von Sialomucinen in der Prostata des Erwachsenen kann mit folgenden Reaktionen erhärtet werden:

- 1) Enzymatischer Abbau mit Sialidase, Lysozym, Pepsin und Papain. Sialidase trennt die Sialinsäure vom Molekül ab. Dadurch wird die Hale - Reaktion negativ; die PAS-Reaktion bleibt positiv, weil das am Protein verbleibende Hexosamin noch oxydabel ist. Die gleiche Wirkung wird durch die Behandlung mit Säurehydrolyse erzielt. Die Proteolyse bewirkt die enzymatische Spaltung des Trägerproteins in kleine Bruchstücke; dadurch werden die Eisenbindungs- und PAS-Reaktion negativ.
- 2) Chemischer Abbau durch alkalische Hydrolyse entfernt die Oligosaccharide aus dem Molekül. Die Hale- und PAS-Färbungen sind anschließend negativ. Weiterhin zeigen die Sialomucine bei pH 3,5 Metachromasie (Varute 1971). Diese Ergebnisse beweisen den Gehalt an sauren Glykoproteinen

besonders bei Drüsen nach der Pubertät.

Histochemisch lassen sich die nichtsulfatierten epithelialen Sialomucine (Spicer, Leppi u. Stoward 1965) in drei Klassen einteilen:

1. Perjodreaktiv und sialidaselabil
2. Perjodreaktiv und sialidaselabil, aber auch
perjodsäureresistent
3. Sialidaseresistent.

Bei den gefundenen Sialomucinen handelt es sich um solche der ersten Gruppe.

Die Eisenbindungsreaktion nach Hale - Müller fällt bei den kindlichen Drüsen wesentlich kräftiger aus, als bei jugendlichen und erwachsenen Organen. Die Alcianblaufärbung pH 2,0 ist abhängig von der Fixierung. Die N-Cetylpyridiniumchlorid-Formol-Fixierung nach Williams blockiert durch Bildung von unlöslichen Salzen die Alcianophilie (Velican 1969). Die Eisenbindungsreaktion wird durch Methylierung blockiert und durch anschließende Demethylierung wieder in vollem Umfang positiv. Dieses Verhalten wird als

typisch für carboxylsaure MPS angesehen. Die Inkubation der Schnitte mit Hyaluronidase bewirkt eine massive Abschwächung der Eisenbindung und zeigt damit, daß diese Reaktion durch Hyaluronsäure, Chondroitinschwefelsäure A u. C hervorgerufen wird.

Die ausgeprägte Alcianophilie (pH 2,0) und intensive Eisenbindungsreaktion jugendlicher Organe ließen eine Metachromasie erwarten. Anscheinend genügt aber die bloße Anwesenheit von sauren Gruppen nicht für eine metachromatische Reaktion (Fischer 1969). Diese trat indessen nur beim Organ des Erwachsenen nach Anfärbung mit DMMB bei pH 3,5 auf und ist wohl auf den Sialomucingehalt zu beziehen. Bei den kindlichen Organen kann eine Metachromasie nur durch Inkubation mit H_2SO_4 erzeugt werden. Hyaluronsäure reagiert erst nach Sulfatierung mit Schwefelsäure metachromatisch (Moore u. Schoenberg 1957). Hyaluronsäure kann zwar in höheren Konzentrationen metachromatisch sein (Mowry 1963, Curran 1964, zit. in Ganter u. Jollès 1969), doch ist bei physiologischen Mengen eine Metachromasie nicht zu erwarten.

Bei den jugendlichen Organen läßt sich die positive PAS-Reaktion damit begründen, daß saure MPS auch PAS positiv sein können (Scott, Harbinson 1968, 1969).

Nach Franks (1964) enthält das physiologische Prostatasekret neutrale MPS oder Mukoproteine. Dies kann nicht bestätigt werden. Die durchgeführten histochemischen Reaktionen machen deutlich, daß die kindlichen Organe Substanzen enthalten, die hyaluronidaselabil sind und mit der Eisenbindungsreaktion nach Hale - Müller und mit Alcianblau pH 2,0 einen positiven Reaktionsausfall ergeben. Es muß daher auf saure MPS geschlossen werden.

Die verschiedenen Reaktionen sprechen dafür, daß es sich hierbei vorwiegend um Hyaluronsäure, in geringerem Maße auch um Chondroitinsulfat A u. C handelt.

Die normale Prostata des Erwachsenen sezerniert Substanzen, die sialidaselabil, perjodoxydabel und basophil sind. Dies sind Grundeigenschaften

saurer Glykoproteine. Es konnte nachgewiesen werden, daß es sich um c a r b o x y l - s a u r e Sialomucine handelt. Dieser Befund ist von diagnostischer Bedeutung. Franks (1964) hat nämlich festgestellt, daß latente oder manifeste Prostatacarcinome s u l f a t i e r t e Sialomucine sezernieren. Bei latenten Karzinomen konnte er ebenfalls nur sulfatierte Sialomucine nachweisen. Bei den methodischen Schwächen der Untersuchungen von Franks müßte dies aber eingehend untersucht werden. Für die untersuchten Prostatae des Erwachsenen konnte ich mit Sicherheit nachweisen, daß sie nur carboxylsaure Sialomucine enthalten.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die histochemischen Untersuchungen an 10 menschlichen Vorsteherdrüsen zwischen 1 und 27 Jahren führten zu folgenden Ergebnissen:

- 1) Die Schleimsubstanzen verändern sich während der Entwicklung.
- 2) Im Alter bis zu 10 Jahren enthalten die Epithelzellen und das Sekret vor allem saure Mukopolysaccharide (Hyaluronsäure, Chondroitinschwefelsäure A u. C).
- 3) Die Drüsen vor und während der Pubertät zeigen einen vermehrten Ribonukleinsäuregehalt.
- 4) Bei den erwachsenen Organen bedeuten die histochemischen Befunde das Vorkommen von carboxylsauren Glykoproteinen (Sialomucine).

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1) Arnold, M.:

Histochemie

1. Aufl., Berlin 1968

2) Fischer, F.:

Beiträge zur Histochemie der
menschlichen Glandulae vestibulares
maiores bei Feten und Neugeborenen.
Acta histochem. 32, 50-56, 1969

3) Franks, L.M., J.D. O'Shea, A.E.R. Thomson:

Mucin in the Prostate: A Histochemical
Study in Normal Glands, Latent, Clinical
and Colloid Cancers.
Cancer 17, 983-991, 1964

4) Ganter, P., G. Jollès:

Histochimie normale et pathologique.
1. Aufl., Paris 1969

5) Geyer, G.:

Ultrahistochemie
1. Aufl., Stuttgart 1969

6) Gottschalk, A.:

The structure of the prosthetic
group of bovine submaxillary gland
mucoprotein.

Biochim. Biophys. Acta 24, 649-653,
1957

7) Graumann, W.:

Handbuch der Histochemie.

Bd. II, 2, Stuttgart 1964

8) Halbhuber, U., K.-J. Halbhuber:

Vergleichend-histochemische Unter-
suchungen am Sekret der Orbitaldrüsen
einiger Säuger und der Tränendrüse
des Menschen.

Acta histochem. 37, 268-301, 1970

9) Halbhuber, K.-J., G. Geyer:

Histochemischer Nachweis von Sialomucin
in den Glandulae bulbourethrales et
vestibulares majores.

Acta histochem. 21, 143-149, 1965

10) Ishihara, M.:

Über das Lipopigment der Prostata-
drüsen und über die Pigmente des
Ductus ejaculatorius und der Prostata-
muskulatur.

Folia urologica 9, 280-298, 1914

11) Kolb, E.:

Körper- und Zellbestandteile

Allgemeines u. Hauptorgane

In Biochemisches Handbuch

Hrsg. H.M. Rauen

Bd. II, 2, 330-401, Berlin 1964

12) Leutert, G., G. Jahn:

Über altersabhängige histologische
und histochemische Befunde an der
Prostata des Menschen.

Acta histochem. 37, 136-147, 1970

13) Mann, T.:

The Biochemistry of Semen and of
the Male Reproductive Tract.

2. Aufl., London 1964

14) Müller, G.:

Über eine Vereinfachung der Reaktion
nach Hale.

Acta histochem. 2, 68-70, 1955

15) Mundkur, B., B. Brauer:

Selektive Localization of Nucleolar
Protein with Amido Black 10 B.

J. Histochem. Cytochem. 14, 94-103, 1966

16) Moore, R.D., M.D. Schoenberg:

Low temperature sulfation of tissues
and the demonstration of metachromasy.

Stain. Technol. 32, 245-247, 1957

17) Pearse, A.G.E.:

Histochemistry,
Theoretical and Applied.

2. Aufl., London 1961

18) Pioch, W.:

Über die Darstellung saurer Muko-
polysaccharide mit dem Kupferphthalo-
cyaninfarbstoff Astrablau.

Virchows Arch. path. Anat. 330, 337-346,
1957

19) Pigman, W., Y. Hashimoto:

Composition of bovine submaxillary
mucins.

Biochem. Biophys. Acta 69, 579-580, 1963

20) Pretl, K.:

Zur Frage des Lipoid- bzw. Lipoid-
proteinstoffwechsels der menschlichen
Vorsteherdrüse.

Virchows Arch. path. Anat. 315, 229-249,
1948

21) Quintarelli, G., S. Tsuiki, Y. Hashimoto, W. Pigman:

Histochemical studies of bovine salivary
gland mucins.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 2, 423-433,
1960

22) Romeis, B.:

Mikroskopische Technik.

16. Aufl., München 1968

23) Schlachta, J.:

Beiträge zur mikroskopischen Anatomie
der Prostata und Mamma des Neugeborenen.

Arch. mikr. Anat. 64, 405-483, 1963

- 24) Schrodtt, G.R., M. Murray:

The Keratin Structure of Corpora
Amylacea.

Arch. Pathol. 82, 518-525, 1966

- 25) Scott, J.E., R.J. Harbinson:

Periodate Oxidation of Acid Poly-
saccharides.

I. Inhibition of electrostatic field
of the substrate.

Histochemie 14, 215-220, 1968

Periodate Oxidation of Acid Poly-
saccharides.

II. Rates of Oxidation of Uronic Acids
in Polyuronides and Acid Mucopoly-
saccharides.

Histochemie 19, 155-161, 1969

- 26) Sehrt, E.:

Über das Vorkommen einer doppellicht-
brechenden Substanz als normaler Be-
standteil der Prostataepithelzellen
des Menschen und Farren.

Virchows Arch. path. Anat. 214, 132-137,
1913

27) Spannhof, L.:

Einführung in die Praxis der Histochemie.

1. Aufl., Jena 1964

28) Spicer, S.S., T.J. Leppi, P.J. Stoward:

Suggestions for a histochemical
terminology of carbohydrate rich
tissue components.

J. Histochem. Cytochem. 13, 599-603, 1965

29) Stieve, H.:

Männliche Genitalorgane
Handbuch der mikroskopischen
Anatomie des Menschen.
Bd. VII, 2, Berlin 1930

30) Töpfer, K.-H.:

Die Thiazinfarbstoffe
Progress in Histochem. and Cytochem. 1,
1-70, 1970

31) Varute, V.T., S.K. Jirge:

Histochemical Analysis of Muco-
substances in Oral Mucosa of
Mouthbreeding Cichlid Fish and
Seasonal Variations in them.
Histochemie 25, 91-102, 1971

32) Velican, Č., D. Velican:

Histochimie des glucides en
pathologie humaine.

1. Aufl., Paris 1969

33) Wrobel, K.-H.:

Histologische, histochemische und
elektronenmikroskopische Unter-
suchungen an der Cervix uteri des
Rindes.

Beiheft 15 der Schriftenreihe

"Fortschritte der Veterinärmedizin /
Advances in Veterinary Medicine"

1971

Danksagung

Herrn Prof. Dr. G. Müller möchte ich herzlich für die Überlassung des Themas und für seine freundliche Unterstützung danken.

Den Direktoren des Anatomischen Institutes Herrn Prof. Dr. M. Watzka und Herrn Prof. Dr. A. Mayet danke ich für den mir im Institut zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. G. Aumüller, der mich mit großer Geduld in die Problematik meiner Arbeit eingearbeitet hat.

Außerdem möchte ich mich bei Frau de Cuvry für ihre freundliche Hilfe bei der technischen Anfertigung der Arbeit bedanken.

L e b e n s l a u f

Am 3. Januar 1945 wurde ich in Darscheid, Krs. Daun, als Sohn des Arztes Dr. med. Adolf Bangert und seiner Ehefrau Elsbeth, geb. Rinkel geboren. Mein Vater gründete Ende 1945 in Ulmen eine Arztpraxis. Von 1951 bis 1956 besuchte ich in Ulmen die Grundschule und von 1956 bis 1966 das Staatliche Neusprachliche Gymnasium in Mayen, das ich mit der Reifeprüfung verließ.

An der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz studierte ich vom Sommersemester 1967, legte im Frühjahr 1968 die Naturwissenschaftliche und im Frühjahr 1970 die Ärztliche Vorprüfung ab.

Im ersten klinischen Semester war ich in der medizinischen Fakultät der Technischen Hochschule München eingeschrieben und kehrte nach einem Semester wieder an die Johannes Gutenberg-Universität Mainz zurück. Das medizinische Staatsexamen habe ich am 22. Juni 1973 abgelegt und befinde mich zur Zeit als Medizinalassistent in der Praxis meines Vaters. Die mündliche Doktorprüfung legte ich am 26.9.73 ab.

